ПАРАЗИТОЛОГИЯ, 30, 2, 1996

УДК 576.893.195 : 577

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ УГЛЕВОДНОГО И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА В СПОРАХ МИКРОСПОРИДИЙ NOSEMA CRYLLI

© В. В. Долгих, Е. С. Насонова, Г. Г. Паскерова

В очищенных спорах микроспоридий *Nosema grylli* из жирового тела сверчков *Gryllus bimaculatus* обнаружены активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49), фосфоглюкоизомеразы (КФ 5.3.1.9) и пируваткиназы (КФ 2.7.1.40). В спорах микроспоридий не выявлены достоверные активности гексокиназы (КФ 2.7.1.1), фосфоглюкомутазы (КФ 5.4.2.2), лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27), НАД-зависимой малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.37), алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1) и сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1.). Обсуждаются особенности метаболизма микроспоридий в связи с полученными данными.

Особенности метаболизма микроспоридий остаются почти не исследованными. Мы очистили споры микроспоридий *Nosema grylli* из жирового тела сверчков *Gryllus bimaculatus* и попытались определить активность девяти ферментов углеводного и энергетического обмена в полученном материале.

С этой целью отпрепарированное жировое тело гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с добавлением воды и центрифугировали при 200 g 10 мин в узких пробирках (бакет-ротор). В осадке отбирали белый слой, образованный спорами микроспоридий (Selesnjov e. a., 1995), ресуспендировали его в воде и повторяли центрифугирование и отбор спор несколько раз до образования чистого белого осадка. Споры наносили на 80 %-ный глицерин и центрифугировали при 800 g 15 мин. Жидкость над глицерином и верхний слой глицерина (приблизительно 1/5 объема) отбрасывали, а оставшийся объем разводили в 3 раза водой и центрифугировали при 200 g 10 мин. Споры отмывали от глицерина центрифугированием при том же режиме, ресуспендировали осадок в 100 мМ трис-HCl буфере (pH 7.8), содержащем 0.3 М сахарозу и лизоцим (5 мг/мл) для разрушения клеточной стенки бактерий и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем к суспензии спор добавляли детергент тритон Х-100 до конечной концентрации 0.1 % и инкубировали 30 мин при тех же условиях. Споры тщательно отмывали в воде от растворенных веществ, центрифугируя при 200 g 10 мин несколько раз и ресуспендировали осадок в свежеприготовленном 100 мМ трис-HCl буфере (pH 7.8), содержащем 0.3 М сахарозу. Очищенные споры гомогенизировали в течение 30—40 мин в плотном стеклянном гомогенизаторе при +4°. При этом наблюдались разрушение и экструзия около 50 % спор и появление в гомогенате значительного количества растворимого белка. Степень разрушения (экструзии) была выше при гомогенизации густой суспензии спор. Часть гомогената отбирали для тестирования активности сукцинатдегидрогеназы, а к остальному объему добавляли тритон

X-100 до концентрации 0.1 % и инкубировали в течение 20–30 мин на холоду. Гомогенат центрифугировали при 6000 g 15 мин и температуре +4°. Супернатант хранили в ледяной бане и использовали для определения активности ферментов.

Активность изучаемых ферментов за исключением сукцинатдегидрогеназы определяли спектрофотометрическим методом в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см при длине волны 340 нм и температуре +37°. Реакционная смесь для определения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49): 100 мМ трис-HCl (pH 7.8), 5 мМ $MgSO_4$, 1.25 мМ глюкозо-6-фосфат–Na_2, 0.1 мМ НАДФ–Na, 100 и 200 мкг белка. Контроль не содержал глюкозо-6-фосфат–Na_2 или НАДФ. Смесь для гексокиназы (КФ 2.7.1.1): 100 мМ трис-HCl (pH 7.8), 5 мМ $MgSO_4$, 1 мМ глюкоза, 1 мМ АТФ–Na_2, 0.5 мМ НАДФ–Na, 0.4 Е/мл активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 250 мкг белка. Контроль не содержал глюкозу или АТФ. Смесь для фосфоглюкомутазы (КФ 5.4.2.2): 100 мМ трис-HCl (pH 7.8), 5 мМ $MgSO_4$, 1 мМ глюкозо-1-фосфат–Na_2, 0.5 мМ НАДФ–Na, 0.4 Е/мл активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 250 мкг белка. Контроль не содержал глюкозо-1-фосфат. Смесь для фосфоглюкоизомеразы (КФ 5.3.1.9): 100 мМ трис-HCl (pH 7.8), 5 мМ $MgSO_4$, 1 мМ фруктозо-6-фосфат–Na_2, 0.5 мМ НАДФ–Na, 0.4 Е/мл активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 4 и 8 мкг белка. Контроль не содержал фруктозо-6-фосфат. Смесь для пируваткиназы (КФ 2.7.1.40): 100 мМ трис-HCl (pH 7.8), 100 мМ KCl, 5 мМ $MgSO_4$, 1 мМ фосфоенолпируват–Na_3, 1 мМ АДФ–Na, 0.125 мМ НАДН–Na_2, 0.5 Е/мл активности лактатдегидрогеназы, 120 и 240 мкг белка. Контроль не содержал пробу или фосфоенолпируват или АДФ. Смесь для НАД-зависимой малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.37): 100 мМ трис-HCl (pH 7.8), 1 мМ ЩУК, 0.125 мМ НАДН–Na_2, 500 мкг белка. Контроль не содержал щавелево-уксусную кислоту или пробу. Смесь для лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27): 100 мМ К-фосфатный буфер (pH 7), 1.6 мМ пируват–Na, 125 мкМ НАДН–Na_2, 500 мкг белка. Контроль не содержал пируват или пробу. Смесь для алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1): 100 мМ трис-HCl (pH 7.8), 2.8 % этанола, 0.5 мМ НАД, 200 мкг белка. Контроль не содержал НАД. Коэффициент дифференциальной молярной экстинции НАД (НАДФ) и НАДН (НАДФН) при данной длине волны принимали равным 6220 $M^{-1} \cdot см^{-1}$. Активность сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1.) определяли в гомогенате спор до добавления тритона X-100. Смесь, содержащую 100 мМ К-фосфатный буфер (pH 7.8), 2.5 мМ ЭДТА, 15 мМ азид–Na, 10 мМ сукцинат и пробу (340 мкг белка), инкубировали 5 мин при +30°. Реакцию запускали добавлением феррицианида–K до концентрации 2.5 мМ, проводили в течение часа при +30° и останавливали добавлением ТХУ до 4 %. Смесь инкубировали 20 мин на холоде, центрифугировали при 6000 g 15 мин и определяли оптическую плотность супернатанта при длине волны 420 нм. В контроле сукцинат вносили после добавления ТХУ. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976).

В результате исследования в спорах микроспоридии *Nosema grylli* выявлена активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, фосфоглюкоизомеразы и пируваткиназы. Удельная активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы составила 14.1 ± ± 0.9 нмоль/мин · мг белка. Фермент специфичен в отношении НАДФ. При добавлении в реакционную смесь НАД вместо НАДФ активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы не наблюдалась. Следует отметить, что хранение пробы при температуре выше 4° приводит к инактивации этого фермента. Обнаружена очень высокая удельная активность фосфоглюкоизомеразы, которая составила 1325.8 ± ± 209.3 нмоль/мин · мг белка. Удельная активность для пируваткиназы составила 5.9 ± 0.5 нмоль/мин · мг белка. С помощью использованных методик мы не обнаружили в спорах микроспоридий достоверной активности гексокиназы, фосфоглюкомутазы, НАД-зависимой малатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы. При добавлении пирофосфата вместо АТФ в смесь для определения гексокиназы активность также не наблюдалась. Вместе с тем у ряда простейших пирофосфат выполняет роль АТФ в реакциях гликолиза. Следует отметить, что активность фосфоглюкомутазы измерялась без добавления участвующего в реакции глюкозо-1, 6-дифосфата. Однако препараты глюкозо-1-фосфата содержат примесь этого соединения и использованная методика позволила нам выявить активность фосфоглюкомутазы в жировом теле хозяина (сверчков) и азотфиксирующих клубеньках гороха.

Полученные данные позволяют предположить, что гликолиз играет важную роль в энергетическом обмене микроспоридий. Представляет интерес очень высокая удельная активность фосфоглюкоизомеразы в спорах, являющихся стадиями переживания во внешней среде. Возможно, это является следствием активных обменных процессов при спорогенезе или преадаптацией паразита к последующему развитию в новой клетке хозяина. Отсутствие достоверной активности гексокиназы и фосфоглюкомутазы (в пределах чувствительности использованной методики), наряду с высокой активностью фосфоглюкоизомеразы позволяет предположить использование паразитом глюкозо-6-фосфата клетки хозяина в качестве основного источника энергии. Интересно отметить, что важной функцией жирового тела насекомых является превращение гликогена или глюкозы в трегалозу. Трегалоза синтезируется непосредственно из УДФ-глюкозы и глюкозо-6-фосфата. Это позволяет предположить синтез значительных количеств глюкозо-6-фосфата в клетках жирового тела. Кроме того, при превращении в гликолизе глюкозо-6-фосфата по сравнению с глюкозой, образуется больше АТФ, так как отсутствует реакция, катализируемая гексокиназой. Обнаружение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы свидетельствует в пользу возможности существования у микроспоридий пентозо-фосфатного пути. Отсутствие активностей лактатдегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы оставляет открытым вопрос о составе конечных продуктов углеводного катаболизма у микроспоридий и механизмах реокисления образующихся в результате гликолиза восстановленных форм НАДН.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ, № 94-04-12972).

Список литературы

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248-254.

Selesnjov K., Issi I., Dolgikh V., Belostotskaya G., Antonova O., Sokolova J. Fractionation of different life cycle stages of microsporidia Nosema grylli from crickets Gryllus bimaculatus by centrifugation in percoli density gradient for biochemical research // J. Euk. Microbiol. 1995. Vol. 42, N 3. P. 288-292.

Всероссийский институт защиты растений,
Санкт-Петербург–Пушкин, 189620

Поступила 1.10.1995

ACTIVITIES OF ENZYMES OF CARBOHYDRATE AND ENERGETIC METABOLISM IN SPORES OF THE MICROSPORIDIA NOSEMA GRYLLI

V. V. Dolgikh, E. S. Nasonova, G. G. Paskerova

Key words: Microsporidia, *Nosema*, spore, enzyme.

SUMMARY

We examined the activities of nine enzymes in microsporidian spores, which were purified out of the fat body of the crickets *Gryllus bimaculatus*. A special method of spore purification, which included a centrifugation in glycerine density, incubation in lysozyme and Triton X-100 before homogenization, and washing, has been specially elaborated for the present study. The activities of following enzymes were studied: glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49), phosphoglucose isomerase (EC 5.3.1.9) and pyruvate kinase (EC 2.7.1.40). Specific activities for each enzyme were respectively: 14.1 ± 0.9, 1325.8 ± 209.3, 5.9 ± 0.5 nmol/min · mg protein. We did not discovered a reliable activities in hexokinase (EC 2.7.1.1), phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2), lactatedehydrogenase (EC 1.1.1.27), NAD-dependent malatdehydrogenase (EC 1.1.1.37), alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) and succinatedehydrogenase (EC 1.3.99.1) by means of methods used.

The data achieved indicate that glycolysis probably plays an important role in the energetic metabolism of microsporidia. The extremely high activities of the phosphoglucose isomerase, as well as the lack of activities of hexokinase and phosphoglucomutase, at least in the limits of the sensibility method, suggest the possible utilization of glucose-6-phosphate from host cells as the main source of an energy. It is remarkable that the conversion of glycogen of free glucose into trehalose is an important functon of the insect fat body, tha main site of microsporidia development. Trehalose is formed of glucose-6-phosphate and UDF–glucose. It is likely that glucose-6-phosphate is produced very intensively in the cells of the fat body. The partial involvement of glucose-6-phosphate in the pentose-phosphate pathway is also possible. The absence of lactatedehydrogenase activities leaves open the question of the final products of the carbohydrate katabolism in microsporidia and of mechanism of reoxidation of the reduced NADH forms produced during the glycolisis.